

Protocole d'extraction d'ADN de végétaux et amplification génique fondé sur le kit GMO Investigator de la société Biorad

Dans ce kit 3 paires d'amorces sont utilisées (multiplex)

1 paire d'amorces permet l'amplification d'un fragment d'ADN de 455 pb présent chez tous les végétaux (dans la solution d'amplification* verte SAP),

1 paire d'amorces permet d'amplifier un fragment d'ADN de 203 pb présent chez certains végétaux OGM (dans la solution d'amplification* rose SA0),

1 paire d'amorces permet d'amplifier un fragment d'ADN de 225 pb présent chez certains végétaux OGM (dans la solution d'amplification* rose SA0).

(On considère que 85% des OGM végétaux possèdent au moins un de ces deux derniers fragments d'ADN)

Extraction d'ADN

- Peser entre 0,5 à 2g d'aliment et déposer les dans le mortier
- Ajouter un volume v_1 d'eau distillée (à raison de 5 mL d'eau distillée par gramme d'aliment).
- Broyer avec le pilon pendant au moins 2 minutes pour former une suspension épaisse.
- Ajouter de nouveau un volume v_1 d'eau.
- Broyer à nouveau pour obtenir une suspension broyée lisse pouvant être prélevée à la pipette en plastique.
- Pipeter 50 μ L de suspension broyée et les déposer dans un tube contenant 500 μ L d' « Instagène » (matrice permettant d'inhiber les DNAses).
- Agitez les tubes et les placer dans un bain marie à 95°C pendant 5 minutes
- Centrifuger à haute vitesse pendant 5 minutes. (7000 tr/min)
- Refroidir sur un lit de glace.
- Le surnageant contient l'ADN

Préparation des réactions PCR

- Placer chaque tube de PCR dans un adaptateur sur un lit de glace
- Introduire 20 μ L de solution d'amplification* (SA0 ou SAP)
- Ajouter 20 μ L d'ADN avec un cône neuf à chaque fois
- Mélanger par pipetage
- Centrifuger si nécessaire
- Placer le tube dans le thermocycleur

Réactions PCR

- o Dénaturation initiale 94°C 2 minutes
- o 40 cycles
 - Dénaturation 94°C 1 minute
 - Hybridation 59°C 1 minute
 - Elongation 72°C 2 minutes
- o Elongation finale 72°C 10 minutes, maintien 4°C

Electrophorèse

- Préparer le gel d'agarose à 3% en tampon TAE 1X
- Préparer les produits PCR pour le dépôt : ajouter 10 μ L de charge orange (TG) à chaque essai PCR et mélanger (prendre un nouveau cône à chaque fois)
- Réaliser les dépôts : 20 μ L pour le marqueur de poids moléculaire et 20 μ L de chaque essai de PCR préparé pour le dépôt.
- Faire migrer à 100V pendant 1h30 à 2heures.

Coloration

- Colorer pendant 3 minutes maximum dans un bain de fast blast stain de biorad(100X)
- Passer 10 secondes dans un bain d'eau de 55 à 60°C
- Puis pendant 5 minutes dans deux bains successifs d'eau à environ 55°C sous agitation.
- Incuber 15 minutes à température ambiante à l'obscurité.

Pour cette électrophorèse, le système Flash Gel DNA de la société Lonza peut être une alternative plus rapide et plus simple mais plus onéreuse.

* solution d'amplification : amorces + Taq polymérase + mélange des quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN.